聚合酶連鎖反應 在農業昆蟲鑑定上的應用

◎農試所應動系 張淑貞

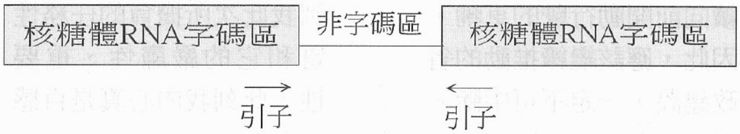
聚合酶連鎖反應的應用原理

1985年Karry Mullis發表聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，廣受各界注目，接下來短短四年內，世界各地相關於聚合酶連鎖反應的報告就超過一千份，而Karry Mullis也因為他在聚合酶連鎖反應方面的成就，獲得1993年的諾貝爾化學獎。因為聚合酶連鎖反應準確、迅速的特質，隨之也被大量應用於昆蟲分類、鑑定上，尤其是傳統分類不易分辨或鑑定程序較複雜耗時的昆蟲。

聚合酶連鎖反應的主要目地是以已知上、下游序列的DNA當引子，將特定的少量DNA在細胞外以2n的速率快速複製放大成較多量，而得以進一步研究分析。而DNA是遺傳因子的本體，有時在複製時會產生錯誤，有些錯誤因不嚴重影響生物的基本生命功能，而會被留下來繼續傳給下一代，於是在漫長的演化中逐漸累積變異，而留在各種不同的生物中。換言之，掌管生物生命基本功能的DNA，較不會累積變異，因為這個部分的錯誤很可能使生物無法進行正常的生命功能而致死亡，這項錯誤也就無法傳給下一代。所以這個部分的DNA演化速率較慢，在各種生物間的相似度較高。例如負責細胞內蛋白質製造的核糖體，在DNA層次上是以核糖體RNA字碼區(rRNA coding region)和非字碼區(non-coding region)組合而成，如圖一。

其中核糖體RNA字碼區將來會轉錄成核糖體的一部分，執行細胞製造蛋白質的生命基本功能，演化速率較慢，在各生物間的相似性較高，非字碼區則無意義，在接下來的過程會被剪掉丟棄。所以可

圖一



玉米螟赤眼卵蜂

用其他生物已知的核糖體RNA字碼區，設計上、下游兩個引子，經聚合酶連鎖反應放大中間變異較大的非字碼區。例如臺灣常用於玉米螟生物防治的玉米螟赤眼卵蜂，和常用於蔗螟生物防治的蔗螟赤眼卵蜂，二者外形相似，體形微小，大約只有0.1公分，無法用肉眼分辨，經聚合酶連鎖反應放大中間變異較大的非字碼區，經電泳染色後，大小差異明顯，可分別鑑定出這兩種蜂。另外根據每一種限制酶只在一段特定的DNA序列剪切的原理，將聚合酶連鎖反應放大後的DNA產物再經不同的限制酶剪切，而因為不同種蟲DNA序列不同，或存有某一特定限制酶切位，或切位位置不同，切下的DNA片段大小也就不同，而得以建立不同種蟲的獨特限制酶圖譜 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)。或者可將聚合酶連鎖反應放大的DNA產物，再經DNA定序的工作，亦可再經比對、研究DNA序列後，設計具種特異性的引子，則以後只要單純的進行聚合酶連鎖反應，就可知道是那種蟲，但這個方法需事先建立完整資料且經審慎實驗後才可使用。在未知生物DNA序列

前，也可以逢機排列方法設計引子，進行聚合酶連鎖反應，這樣的方法又可另稱為逢機放大聚合酶連鎖反應(random amplified polymorphic DNA, RAPD)，可快速得到結果，但需注意這項DNA鑑別特徵在種內的穩定性。

聚合酶連鎖反應在農業昆蟲鑑定上的應用

生物防治是害蟲綜合防治中重要的一環，隨著公眾對環境保護的重視，農藥殘毒和害蟲抗藥性的發生，生物防治也就愈形重要。寄生蜂是害蟲生物防治體系的重要成員，不同種寄生蜂對寄主的專一性、偏好性不同，有些同種內的不同生物小種對寄主的專一性、偏好性也可能不同，所以選擇正確的蜂種，其實是生物防治成功的主要因素。而寄生蜂一般體形微小，不易以傳統分類的方法鑑別，生物小種的分辨尤其更為困難，聚合酶連鎖反應可反應出遺傳因子本體一 DNA的差異，且極為敏感，只需極少量的DNA就可將之複製放大至可分析的量，所以常應用於協助寄生蜂的分類鑑定。例如目前被廣泛應用於世界各地生物防治體系的赤眼卵寄生蜂，應用於蚜蟲生物防治的蚜小蜂和蚜繭蜂，寄生於象鼻蟲和半翅目卵上的纓小蜂，寄生於煙草粉蝨上的恩蚜小蜂和槳蚜小蜂，寄生於積穀害蟲螟蛾的小繭蜂，寄生於田間夜蛾的小繭蜂，都已有相關的應用報告。

聚合酶連鎖反應在害蟲上的應用也很廣泛，因為交通的發達，整個地球被視為一個地球村，而隨著世界貿易組織的成立，各國間的貨物往來越來越頻繁，檢疫害蟲的問題也就越來越受各界的關切，而一般昆蟲的傳統分類鑑定都是以成蟲期的特徵為主，但在海關進口貨物中，除了成蟲外，還常常可以看到幼蟲，所以正確迅速的鑑定幼蟲種類非常重要。而因為DNA是遺傳因子的本體，不會因蟲期的不同而改變，所以可在事前以傳統分類的方法鑑別相關害蟲，再據此以聚合酶連鎖反應建立相關害蟲的DNA鑑別特徵，如DNA序列，往後海關再碰到疑似檢疫害蟲，就可將之進行聚合酶連鎖反應，或進一步分析DNA序列，再與相關害蟲的DNA鑑別特徵比對，即可確定是否為檢疫害蟲，不但較為迅速準確，而且更為客觀。例如分佈廣泛具高生殖力、移動力的東方果實蠅，在地中海沿岸國家、中美洲、南美洲、夏威夷和澳洲危害嚴重的地中海果實蠅，在熱帶和亞熱帶分佈普遍的瓜實蠅，危害許多果樹的蘋果實蠅、櫻桃實蠅、胡桃實蠅，園藝作物重要害蟲的煙草粉蝨和銀葉粉蝨，屬於倉儲害蟲的皮蠹和穀螟，危害許多作物的蚜蟲。另外聚合酶連鎖反應在上也已有相關的研究報告。

結論

總之，因為聚合酶連鎖反應準確迅速的特質，在鑑定應用上已占有舉足輕重的角色，在農業昆蟲鑑定上也甚具發展潛能，值得各界重視。